

## RAPD和SRAP标记技术在苔藓植物 亲缘关系研究中的比较分析

张安世,张为民,邢智峰,刘永英,韦慧彦,辛泽华  
(焦作师范高等专科学校生物系,河南焦作 454003)

**摘要:**利用RAPD和SRAP标记技术研究11种苔藓植物的亲缘关系,并进行比较分析。结果表明:RAPD扩增的多态性比率达100%,SRAP扩增的多态性比率达96.9%,2种标记结果均显示了很高的多态性比率。利用SPSS11.5软件对RAPD和SRAP扩增结果进行了聚类分析,两者均与形态学分类基本一致,但与形态学结果也有一定的差异,这种差异主要表现在科以上植物种类之间。同时,2种分子标记的聚类结果之间也存在一定的差异,主要是对大叶凤尾藓和小牛舌藓全缘亚种的划分。因此,RAPD和SRAP都有一定局限性,需要多种标记方法相互结合、相互印证,才能得出客观的结果。

**关键词:**苔藓;RAPD;亲缘关系;遗传多样性

中图分类号:Q781 文献标志码:A 论文编号:2009-2441

### The Comparative Analysis on the Study of Genetic Relationship of Bryophytes Based on RAPD and SRAP Markers

Zhang Anshi, Zhang Weimin, Xing Zhifeng, Liu Yongying, Wei Huiyan, Xin Zehua  
(Department of Biology, Jiaozuo Teachers College, Jiaozuo Henan 454003)

**Abstract:** RAPD and SRAP markers were applied to assess genetic relationship in 11 individuals of bryophytes. The results showed that both of techniques detected high proportion of polymorphic bands, which were 100% from RAPD and 96.9% from SRAP. By means of cluster analysis using SPSS11.5 software, the resultant dendrograms from RAPD and SRAP analyses were showed the generally correspondence with morphological classification except for some species among family. Comparing the two techniques, there were also some differences between SRAP and RAPD markers, mainly in the classification of *Fissidens grandifrons* Brid. and *Anomodon minor*(Hedw.) Fuernr. ssp.*integerrimus*(Mitt.)Iwats. Therefore, RAPD and SRAP had certain limitations, and two molecular techniques should be combined in practice in order to obtain objective results.

**Key words:** bryophytes; RAPD; genetic relationship; genetic diversity

#### 0 引言

苔藓植物是以孢子繁殖,由水生向陆生过渡的一个植物类群,在植物界的系统演化中占据着特殊地位。全世界的苔藓植物约有23000种,在高等植物中其种类仅次于被子植物,中国约有2709种,是世界上苔藓植物多样性最丰富的国家之一<sup>[1]</sup>。近年来随着分子生物学发展,特别是分子标记技术的应用<sup>[2-6]</sup>,为探讨

苔藓植物的遗传多样性、遗传结构、系统演化和分类位置提供了依据。

目前,常用的DNA分子标记技术主要有RAPD、SSR、AFLP和SRAP等,且在种植资源鉴定、遗传多样性分析等方面都有较广泛的应用。每种分子标记技术都有其独特性和局限性。由于RAPD技术具有价格低廉、简便快捷、对模板DNA需要量极少、对DNA要求

**基金项目:**河南省科技攻关项目“太行山苔藓植物资源调查及新型生物工程载体开发”(0624240019);河南省教育厅自然科学研究计划项目“河南省苔藓植物的系统发育研究”(2008C180002)。

**第一作者简介:**张安世,男,1965年出生,副教授,硕士,主要从事植物分子生物学研究。通信地址:454003河南省焦作市山阳路998号焦作师范高等专科学校生物系, Tel: 0391-3583122, E-mail: aszhang1212@163.com。

**收稿日期:**2009-11-20, **修回日期:**2009-12-09。

不高等优点而成为研究生物多样性和亲缘关系的重要方法之一。SRAP是近几年开发的一种新型分子标记技术,具有RAPD的操作简便性,与SSR相比,省去了开发引物的困难,同时又避免了AFLP的酶切、连接和扩增杂交等繁琐步骤,因此,SRAP分子标记技术具有以往的一些分子标记技术不可比拟的优越性<sup>[7-9]</sup>,它一经问世便受到大多数分子生物学家的青睐。该研究利用RAPD和SRAP两种分子标记方法对11种苔藓植物进行遗传多样性分析,旨在为苔藓植物的系统发育研

究和分子标记图谱构建提供分子生物学依据,同时对两者的结果进行比较分析,探讨两者在研究苔藓植物遗传多样性上的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

此实验所用苔藓均采自河南省云台山世界地质公园(表1)。选取幼嫩茎叶,用塑料袋封装,然后装入冰盒保鲜,带回实验室后分别用自来水、超纯水漂洗2次除去尘渣等杂物,用吸水纸吸干后保存于-80℃冰箱备用。

表1 苔藓植物种类名称

编号	种名	科名
1	鳞叶藓 <i>Taxiphyllum taxirameum</i> (Mitt.) Fleish.	灰藓科 Hypnaceae
2	金灰藓 <i>Pylaisiella polyantha</i> (Hedw.) Grout	灰藓科 Hypnaceae
3	黄灰藓 <i>Hypnum pallescens</i> (Hedw.) P. Beauv.	灰藓科 Hypnaceae
4	灰藓凹叶变种 <i>Hypnum cupressiforme</i> Hedw. Var. <i>Lacunosum</i> Brid	灰藓科 Hypnaceae
5	大叶凤尾藓 <i>Fissidens grandifrons</i> Brid.	凤尾藓科 Fissidentaceae
6	多枝青藓 <i>Brachythecium fasciculirameum</i> C. Muell.	青藓科 Brachytheciaceae
7	弯叶青藓 <i>Brachythecium reflexum</i> (Stark.) B. S. G	青藓科 Brachytheciaceae
8	牛角藓 <i>Cratoneuron filicinum</i> (Hedw.) Spruce	柳叶藓科 Amblystegiaceae
9	小牛舌藓全缘亚种 <i>Anomodon minor</i> (Hedw.) Fuernr. ssp. <i>integerrimus</i> (Mitt.) Iwats.	牛舌藓科 Anomodontaceae
10	拟溪边扭口藓 <i>Barbula subrivicola</i> Chen	丛藓科 Pottiaceae
11	卷叶毛口藓 <i>Trichostomum involutum</i> Broth.	丛藓科 Pottiaceae

### 1.2 试剂和仪器

1.2.1 试剂 Taq DNA聚合酶、dNTP和SRAP引物购自上海生工生物工程技术有限公司;RAPD引物购自北京赛百盛基因技术有限公司;无CTAB缓冲液:200mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 50mmol/L EDTA(pH8.0), 250mmol/L NaCl, 2% PVP; 2×CTAB: 2% CTAB, 100mmol/L Tris-HCl(pH8.0), 1.4mol/L NaCl, 20mmol/L EDTA(pH8.0)

1.2.2 仪器 5804R型冷冻离心机(Eppdoff), UV-1700(日本岛津)紫外分光光度计, PTC-200PCR仪, ChampGel-3220凝胶成像系统。

### 1.3 总DNA的提取

参考文献[10]。

### 1.4 扩增条件

RAPD扩增条件: Taq酶, 1.0U; Mg<sup>2+</sup>浓度, 2.0 mmol/L; dNTP浓度, 0.2 mmol/L; 模板DNA 60ng; 引物浓度, 10 pmol。反应体积为25μL。RAPD扩增程序为: 94℃预变性3 min; 94℃变性1 min, 36℃复性1 min, 72℃延伸2 min, 循环43次; 72℃延伸10 min; 4℃保存。SRAP扩增条件: Mg<sup>2+</sup>: 2.5 mmol/L; dNTP: 0.3 mmol/L; 引物: 15pmol; Taq: 1.5U。SRAP扩增程序为: 94℃

预变性5 min; 94℃变性1 min, 33℃复性1 min, 72℃延伸1.5 min, 循环5次; 94℃变性1 min, 53℃复性1 min, 72℃延伸1.5 min, 循环35次; 72℃延伸7 min; 4℃保存。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶(含0.5μg/mL溴化乙锭)、1×TBE缓冲液、3V/cm电场中电泳分离,在凝胶成像系统上观察拍照。

### 1.5 引物选择

选取北京赛百盛基因技术有限公司合成的RAPD引物B组和C组引物共40个;选取上海生工生物工程技术有限公司合成的SRAP引物,其中正向引物为Me1, Me2, Me3, Me4, Me5, Me6, 反向引物为em7, em8, em9, em10, em11。正向、反向引物两两组合,选取其中30个引物组合。以11种苔藓植物为材料进行RAPD和SRAP扩增,从中选取多态性高、重复性好且DNA条带清晰的引物进行重复试验。

### 1.6 数据统计及聚类分析

根据扩增产物的电泳结果,统计每个引物扩增的条带数,在同一位置上出现的条带计为1,无则计为0,构建(0,1)矩阵,计算扩增产物的总条带数、多态性条带及多态性比率。应用SPSS11.5分析软件,按Average Linkage法进行聚类分析,建立聚类树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 扩增产物的多态性比较分析

利用 11 个苔藓植物的 DNA 模板分别对所供的 RAPD 引物和 SRAP 引物进行筛选,共选出 B<sub>8</sub>、B<sub>10</sub>、B<sub>20</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>6</sub>和 C<sub>15</sub>等 6 个 RAPD 引物和 Me5/em7、Me5/em8、Me6/em11、Me5/em9、Me2/em10 等 5 个 SRAP 引物组合。各引物序列见表 2。利用筛选出的 RAPD 和 SRAP 引物对 11 种苔藓植物进行重复扩增。结果表明,6 个 RAPD 引物共扩增出 77 条带,平均每个引物扩增 12.8 条带,5 个 SRAP 引物组合共扩增出的条带总数为 71 条,平均每个引物组合扩增 14.2 条带。研究结果还显示,6 个 RAPD 引物所扩增的 77 个条带均为多态

性条带,多态性比率高达 100%。在 5 个 SRAP 引物组合所扩增的 71 个条带中,共占据 65 个位点,多态性条带 63 条,多态性比率为 96.9%。因此两种标记的结果均显示了很高的多态性比率,说明 11 种苔藓植物遗传性差异较大,基因型间具有高度的遗传多态性。但就每个引物平均扩增的条带数而言,SRAP 扩增更多。图 1 和图 2 显示 RAPD 引物 B<sub>20</sub>和 SRAP 引物 Me6/em11 对 11 种苔藓植物的扩增结果。

### 2.2 遗传多样性和聚类结果的比较分析

将 SRAP 和 RAPD 引物扩增后得到的二元数据应用 SPSS11.5 软件进行分析,对供试材料根据欧氏遗传距离,按 Average Linkage 法进行聚类分析,建立聚类树

表 2 RAPD 和 SRAP 引物

RAPD 引物	序列(5'→3')	SRAP 引物	序列(5'→3')
B <sub>8</sub>	GTCCACACGG	Me5/em7	Me5: TGAGTCCAAACCGGAAG; em7: GACTGCGTACGAATTGAG
B <sub>10</sub>	CTGCTGGGAC	Me5/em8	Me5: TGAGTCCAAACCGGAAG; em8: GACTGCGTACGAATTGCC
B <sub>20</sub>	GGACCCTTAC	Me6/em11	Me6: TGAGTCCAAACCGGTAA; em11: GACTGCGTACGAATTCCA
C <sub>4</sub>	CCGCATCTAC	Me5/em9	Me5: TGAGTCCAAACCGGAAG; em9: GACTGCGTACGAATTCGA
C <sub>6</sub>	GAACGGACTC	Me2/em10	Me2: TGAGTCCAAACCGGAGC; em10: GACTGCGTACGAATTCAG
C <sub>15</sub>	GACGGATCAG		

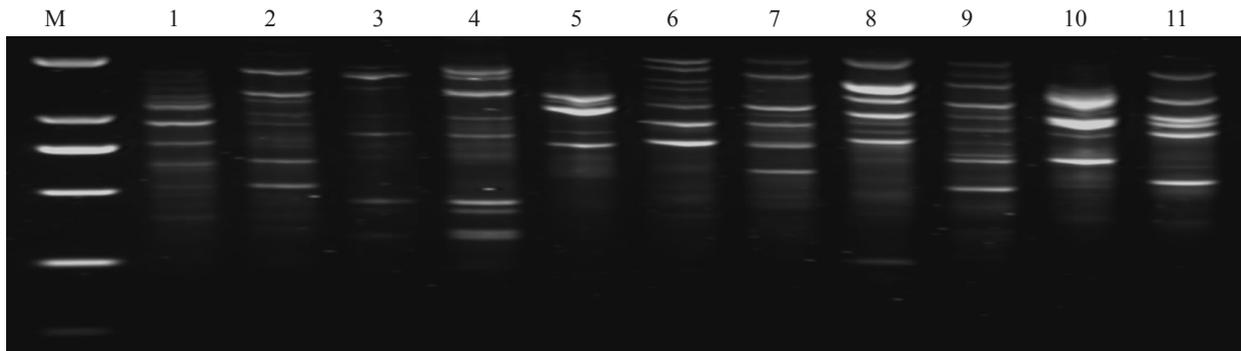


图 1 引物 B<sub>8</sub>对 11 种苔藓植物的 RAPD 扩增结果

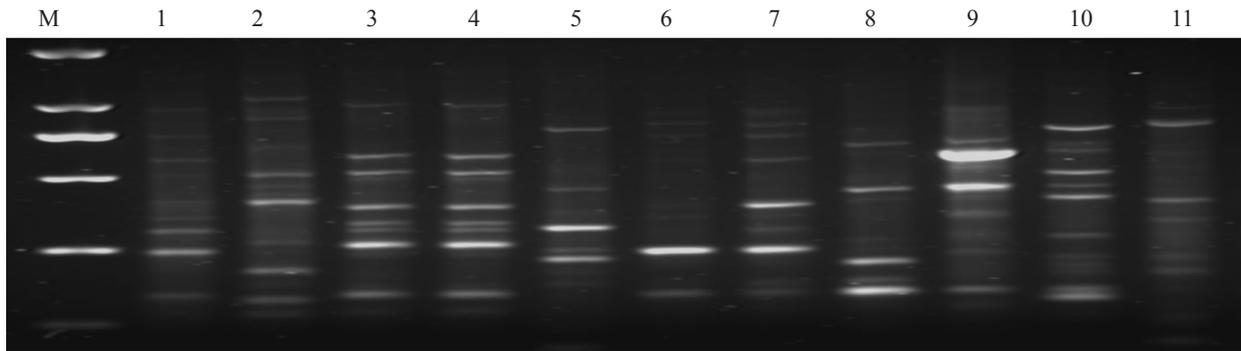


图 2 引物 Me5 / em8 对 11 种苔藓植物的 SRAP 扩增结果

状图(图3和图4)。从图3和图4可知,SRAP和RAPD的聚类结果都可将11种苔藓植物分为3大类,且都将牛角藓单独划为一类。在各大类中,凡属同科的苔藓植物都能很好的聚类在一起,如灰藓科的黄灰藓、灰藓凹叶变种、鳞叶藓和金灰藓;青藓科的多枝青藓和弯叶青藓;丛藓科的拟溪边扭口藓和卷叶毛口藓。这与形

态学结果是一致的。特别是SRAP对灰藓科的分析结果与形态学结果完全一致。从相似系数也可以看出(表3和表4),同科内的植物种类间的遗传相似系数均高于它们与其它科植物间的相似系数。特别是黄灰藓和灰藓凹叶变种及多枝青藓和弯叶青藓在两种标记中均表现出很高的遗传相似性。不同科之间的苔藓植物

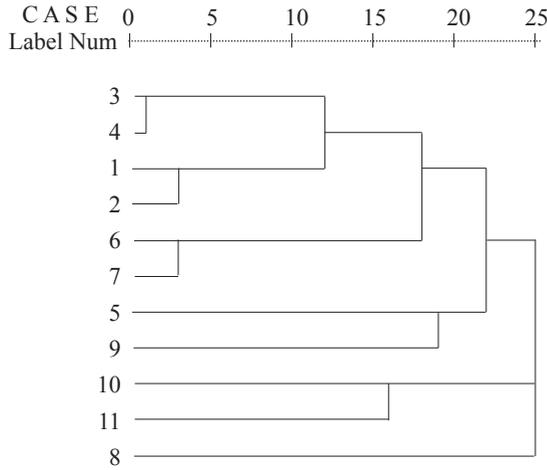


图3 11种苔藓植物的RAPD分析聚类图

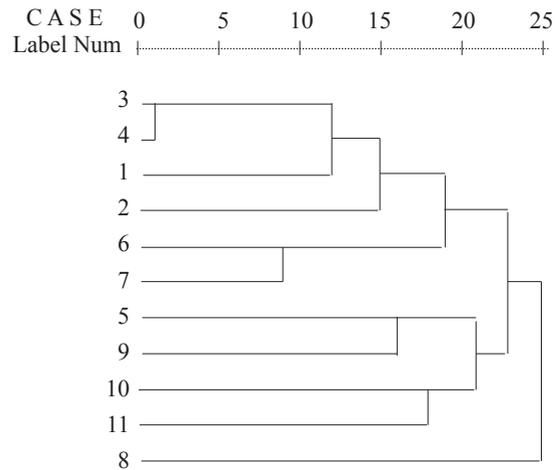


图4 11种苔藓植物的SRAP分析聚类图

表3 11种苔藓植物SRAP分析的相似系数

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1.000										
2	0.410	1.000									
3	0.456	0.324	1.000								
4	0.463	0.329	0.841	1.000							
5	0.059	-0.067	0.078	-0.054	1.000						
6	0.277	0.145	0.083	0.026	0.083	1.000					
7	0.366	0.082	0.350	0.280	0.113	0.550	1.000				
8	-0.100	0.011	-0.006	-0.054	0.162	-0.078	-0.044	1.000			
9	0.122	-0.085	0.046	0.000	0.307	0.312	0.181	0.046	1.000		
10	0.201	-0.005	0.003	0.026	0.003	0.307	0.021	0.003	0.228	1.000	
11	0.138	0.011	0.078	0.027	0.246	0.164	0.192	-0.006	0.133	0.244	1.000

表4 11种苔藓植物RAPD分析的相似系数

样品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	1.000										
2	0.597	1.000									
3	0.412	0.431	1.000								
4	0.354	0.360	0.669	1.000							
5	0.211	0.139	0.033	0.229	1.000						
6	0.273	0.177	0.253	0.304	0.163	1.000					
7	0.284	0.206	0.163	0.293	0.252	0.618	1.000				
8	0.082	0.264	-0.099	0.025	0.118	0.027	-0.013	1.000			
9	0.323	0.155	0.044	0.036	0.206	0.044	0.077	0.068	1.000		
10	0.171	0.093	0.050	0.050	0.073	0.240	0.073	0.007	0.155	1.000	
11	0.029	0.029	-0.014	-0.012	0.139	0.113	0.073	0.071	-0.034	0.288	1.000

种类的相似系数很低,表明它们的遗传差异较大。

但在两种聚类结果所划分的3大类中,第1大类和第2大类的物种组成有所差异。在RAPD的聚类结果中,第1大类包括灰藓科的黄灰藓、灰藓凹叶变种、鳞叶藓和金灰藓;青藓科的多枝青藓和弯叶青藓,以及大叶凤尾藓和小牛舌藓全缘亚种。第2大类包括丛藓科的拟溪边扭口藓和卷叶毛口藓两种。但在SRAP的聚类结果中,将丛藓科的拟溪边扭口藓、卷叶毛口藓、凤尾藓科的大叶凤尾藓和牛舌藓科小牛舌藓全缘亚种划归为一类。形态学结果表明,小牛舌藓全缘亚种、牛角藓和青藓科的多枝青藓和弯叶青藓与灰藓科的黄灰藓、灰藓凹叶变种、鳞叶藓和金灰藓亲缘关系较近,大叶凤尾藓和丛藓科的拟溪边扭口藓和卷叶毛口藓亲缘关系较近,因此,无论SRAP还是RAPD的分析结果都与形态学结果有一定差异,而且这种差异主要表现在科以上植物种类之间。

### 3 讨论

RAPD和SRAP等分子标记技术已被证实是分析生物遗传多样性较为有效的方法。

此研究表明,通过RAPD和SRAP分子标记技术得到的聚类分析结果与传统的形态分类结果基本一致。说明了不同标记系统间得出的结论有很大的同一性,同时也说明RAPD和SRAP分子标记技术可以较好的运用到苔藓植物的遗传多样性研究中,具有一定的理论和实际应用价值。

但两者的分析结果均与形态学结果有一定的差异,原因可能是由DNA分子标记和形态学标记本身特点所造成的<sup>[1]</sup>。形态学分类主要是依据植物的表型性状,而表型性状易受环境及基因显隐性的影响,且控制这几个形态特征的基因在整个基因组所占比例较小,不能充分反映植物的遗传特征;而RAPD和SRAP分子标记是通过多个不同的引物扩增整个基因组,反映的是整个基因组结合位点的多态性变化。由于形态学差异和分子水平的差异所经受的进化压力不同,遵循的规律也不尽相同,因此,形态学上的差异并不一定是DNA水平变异的真实反映<sup>[2]</sup>。

此研究还表明,RAPD和SRAP的分析结果也存在一定的差异,两者的差异主要表现在对大叶凤尾藓和小牛舌藓全缘亚种的划分上。按形态学结果,大叶凤尾藓应划在丛藓科所在的一大类,而小牛舌藓全缘亚种应划在牛角藓与青藓科和灰藓科所在的一大类中,SRAP分析结果将小牛舌藓全缘亚种划在了丛藓科所在的一大类,而RAPD将大叶凤尾藓划在了灰藓

科所在的一大类。因此,现行的任何一种检测手段都不是万能的,都有一定的局限性,因此需要多种标记方法相互结合、相互印证,才能得出客观的结果。但就对灰藓科的分析结果来看,SRAP结果更为准确,它与形态学结果完全一致,可能是由于SRAP技术扩增的是基因的重要组成部分开放阅读框(ORFs),因而更能反映遗传资源的多样性<sup>[13]</sup>。

### 4 结论

利用RAPD和SRAP分子标记技术研究了11种苔藓植物的亲缘关系,并进行了比较分析。两种标记的分析结果均与形态学结果基本一致,但也存在一定的差异,这种差异主要表现在科以上种类之间。同时,两种标记结果之间也存在一定差异,主要表现在对大叶凤尾藓和小牛舌藓全缘亚种的划分上。

### 参考文献

- [1] 吴鹏程,贾渝,汪眉枝. 中国与北美苔藓植物区系关系的探讨[J]. 植物分类学报,2001,39(6):526-539.
- [2] 王艇,朱建明,苏应娟,等. 部分苔藓植物rbcL基因PCR-RFLP分析[J]. 西北植物学报,2000,20(6):968-973.
- [3] 施定基,冉亮,宁叶,等. 苔藓分子生物学的一些进展[J]. 贵州科学,2001,19(4):1-5.
- [4] 王先平,胡勇,何奕昆. 基因定点整合技术及其在苔藓研究中的进展[J]. 植物学通报,2003,20(2):137-143.
- [5] 沙伟,王艳丽,腾兆岩. 毛尖紫萼藓总RNA提取方法的研究[J]. 武汉植物学研究,2007,25(3):310-312.
- [6] 沙伟,师帅. 东亚砂藓取材部位对提取其总RNA及DDRT-PCR的影响[J]. 广西植物,2008,28(3):298-301.
- [7] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Comparative analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phlogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs, and SRAPs [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109:280-288.
- [8] Ferriol M, Plco B, Nuez F. Genetic diversity of a gemplasm collection of cucurbitapepo using SRAP and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107:271-282.
- [9] Riaz A, Potter D, Stephen M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers[J]. Amer Soc Hort Sci, 2004,129:204-211.
- [10] 张安世,邢智峰,刘永英,等. 苔藓植物DNA不同提取方法的比较分析[J]. 河南科学,2009,27(5):559-562.
- [11] 区又君,吴勇,李加儿,等. 5种石斑鱼遗传差异的RAPD分析[J]. 南方水产,2008,4(2):56-62.
- [12] Bachmann K. Phenotypic similarity and genetic relationship among populations of *Microseris bigelovii*(Asteraceae: Lactuceae). Bot Acta, 1992, 105: 337-342.
- [13] 林忠旭,张献龙,聂以春. 新型标记SRAP在棉花F2分离群体及银川多样性评价中的适用性分析[J]. 遗传学报,2004,31(6):622-626.